

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004250

International filing date: 10 March 2005 (10.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-114793
Filing date: 13 March 2004 (13.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 09 June 2005 (09.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

11.03.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 3月13日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-114793

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

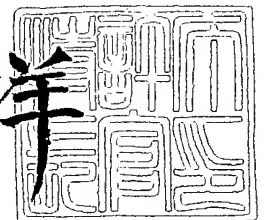
J P 2004-114793

出 願 人
Applicant(s): テムリック株式会社

2005年 5月26日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



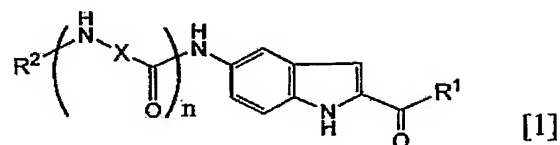
【書類名】 特許願
【整理番号】 P2004-01
【提出日】 平成16年 3月13日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市上京区大宮通今出川下る薬師町 2 2 5 - 9 0 3
 【氏名】 杉山 弘
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市左京区一乗寺梅ノ木町 1 1 番地メゾン西川 2 階 B 号
 【氏名】 板東 俊和
【特許出願人】
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂 3 丁目 2 1 番 8 号
 【氏名又は名称】 テムリック株式会社
 【代表者】 上野 猛
 【電話番号】 03-3583-3370
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

ヘアピン型ポリアミドが下記一般式 [1]

【化 1】

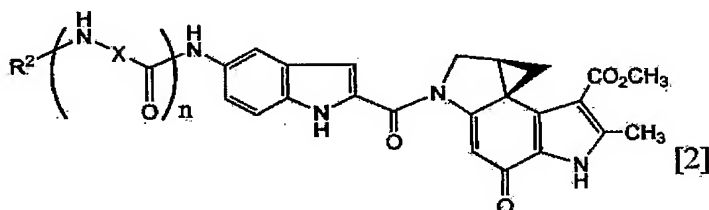


(式中、 m , n はそれぞれ独立した 0-10 の整数を表し、 X はそれぞれ独立した上記構造により任意に構成される。 R^1 はアルキル化反応部位を表し、 R^2 は水素原子、低級アルキル基又はアセチル基からなるピロロールイミダゾールポリアミド化合物を表す。) で示される化合物であるヘアピン型ポリアミド。

【請求項 2】

一般式 [1] で示される化合物が、下記一般式 [2]

【化 2】

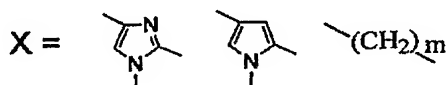
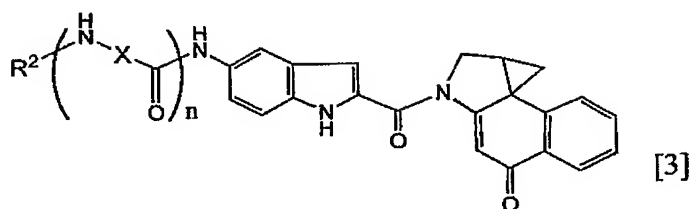


(式中、 m , n はそれぞれ独立した 0-10 の整数を表し、 X はそれぞれ独立した上記構造により任意に構成される。 R^1 はアルキル化反応部位を表し、 R^2 は水素原子、低級アルキル基又はアセチル基からなるピロロールイミダゾールポリアミド化合物を表す。) で示される化合物である請求項 1 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 3】

一般式 [1] で示される化合物が、下記一般式 [3]

【化 3】



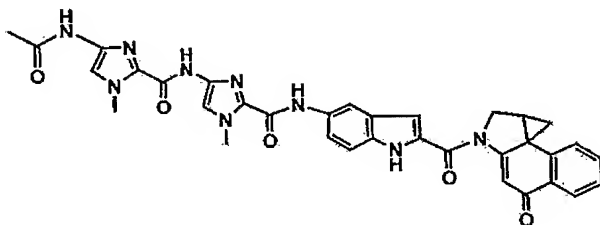
(式中、 m , n はそれぞれ独立した 0-10 の整数を表し、 X はそれぞれ独立した上記構造により任意に構成される。 R^1 はアルキル化反応部位を表し、 R^2 は水素原子、低級ア

ルキル基又はアセチル基からなるピロールーイミダゾールポリアミド化合物を表す。)で示される化合物である請求項 1 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 4】

一般式 [3] で示される化合物が下記構造式

【化 4】

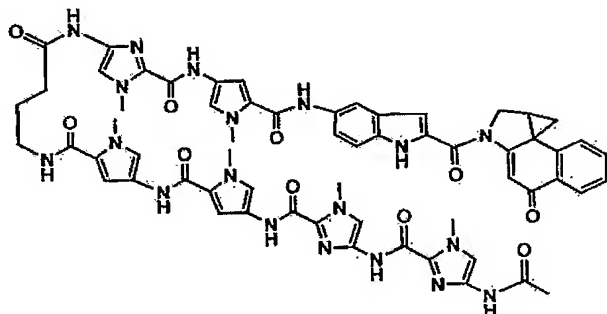


で示される化合物である請求項 3 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 5】

一般式 [3] で示される化合物が下記構造式

【化 5】

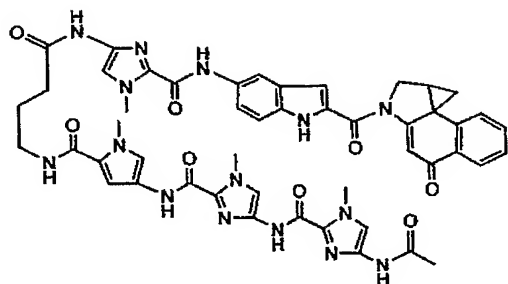


で示される化合物である請求項 3 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 6】

一般式 [3] で示される化合物が下記構造式

【化 6】

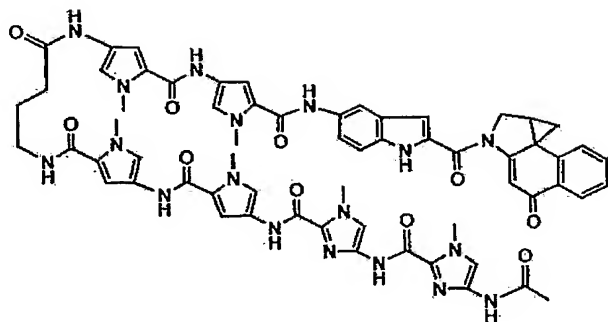


で示される化合物である請求項 3 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 7】

一般式 [3] で示される化合物が下記構造式

【化 7】

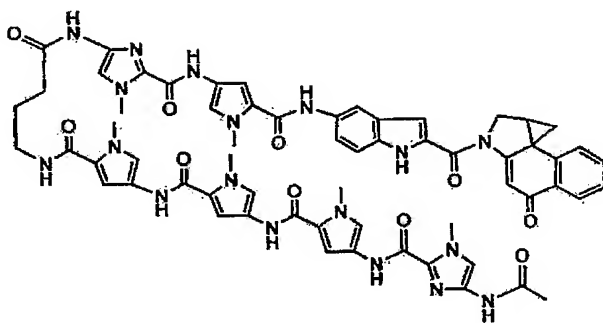


で示される化合物である請求項 3 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 8】

一般式 [3] で示される化合物が下記構造式

【化 8】

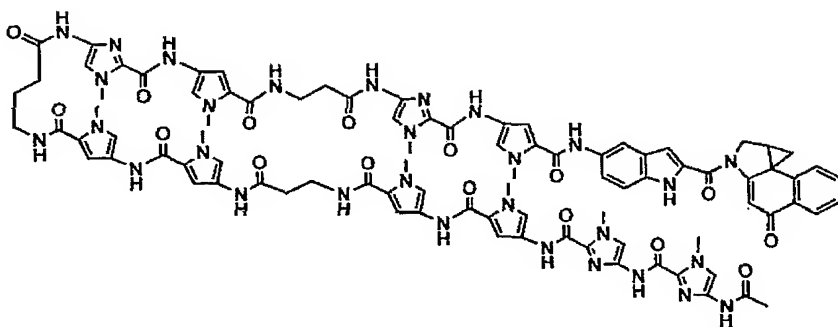


で示される化合物である請求項 3 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 9】

一般式 [3] で示される化合物が下記構造式

【化 9】

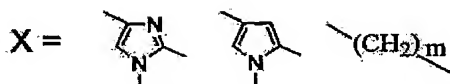
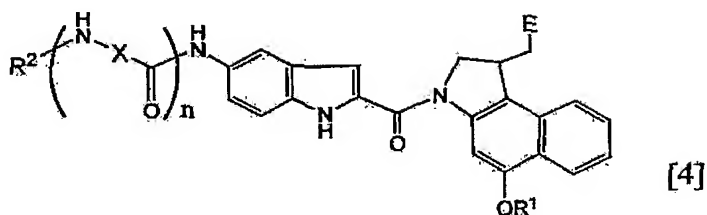


で示される化合物である請求項 3 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 10】

一般式 [1] で示される化合物が、下記一般式 [4]

【化 10】

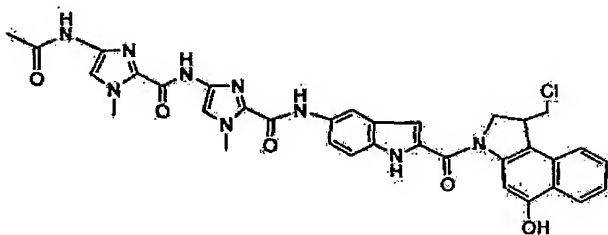


(式中 R^1 は水素原子、又は、ペプチド鎖、糖鎖、ポリエチレングリコール等との水溶性エステル誘導体を表し、 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセチル基を表す。 m , n はそれぞれ独立した 0-10 の整数を表し、 E はハロゲン原子、又は、メシル基、トシル基などの脱離性の高い置換基を示す。 X はそれぞれ独立した上記構造により任意に構成されるピロール-イミダゾールポリアミド化合物を表す。) で示される化合物である請求項 1 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 1 1】

一般式 [4] で示される化合物が下記構造式

【化 11】

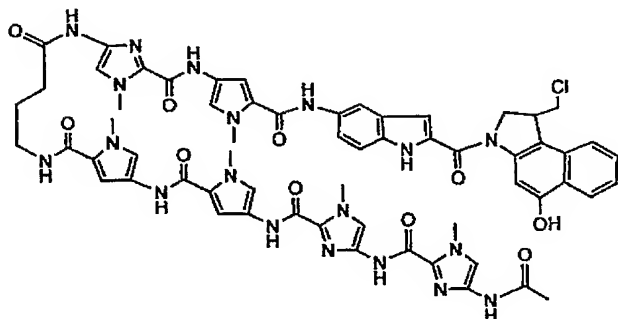


で示される化合物である請求項 1 0 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 1 2】

一般式 [4] で示される化合物が下記構造式

【化 12】



で示される化合物である請求項 1 0 に記載のヘアピン型ポリアミド。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 2 の何れかに記載のヘアピン型ポリアミドを含んでなる遺伝子の発現を抑制する薬剤。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 2 の何れかに記載のヘアピン型ポリアミドを含んでなる、遺伝子の発現を

活性化する薬剤。

【請求項 1 5】

遺伝子が異常遺伝子である請求項 1 3、1 4 に記載の薬剤。

【請求項 1 6】

遺伝子が一塩基多型 (S N P s) である請求項 1 3、1 4 に記載の薬剤。

【請求項 1 7】

請求項 1 ～ 1 2 の何れかに記載のヘアピン型ポリアミドを含んでなる、抗ガン作用を有する薬剤

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な塩基配列特異的認識能を有するヘアピン型ポリアミド

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子異常の発現を抑制し、高い抗ガン作用を有する新規で且つ極めて反応性の高いヘアピン型ピロールーイミダゾールポリアミドに関する。

【背景の技術】

【0002】

ヒトの遺伝子配列の解明がほぼ完了した現在、ある特定の塩基配列に対して特異的な結合能を有する分子に多くの研究者の注目が集まっている。Der vanらは逆平行に配向したピロール(Py)ーイミダゾール(Im)ポリアミドが塩基配列特異的にDNAの副溝(マイナージョイント)に結合することを見出した(例えば、非特許文献1参照)。

【非特許文献1】「J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 7636」

これらの分子は転写因子などに匹敵する結合定数と特異性を有しているが、遺伝子の発現制御は転写因子の結合を阻害することによって行なわれているため、標的とできる塩基配列は極端に限られている(例えば、非特許文献2参照)。

【非特許文献2】「J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 4856」

本発明者らはPy-Imポリアミドに抗生物質であるデュオカルマイシンAのアルキル化部位のセグメントA(Du)を結合したハイブリッド分子を開発し、特許出願している(例えば、特許文献1参照)。そのハイブリッド分子はPy-Imポリアミドによる配列認識能に基づいて450塩基対のDNAのフラグメントの1ヶ所を選択的にアルキル化した(例えば、非特許文献3参照)が、反応の完結には数日を必要とし、反応の効率も数%と低かった

【特許文献1】「WO00/15641号」

【非特許文献3】「J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 4961」

本発明者らは、アルキル化反応部位とPy-Imポリアミドとの間にビニルリンカーを挿入したImPyLDu86(Lはビニルリンカーを示す。以下同じ)が2量体となって選択的に5'-PyG(A/T)CPu-3'(PyとPuはピリミジン塩基、プリン塩基をそれぞれ示す。以下同じ)という配列において5塩基対離れた両方の鎖に低濃度で反応し(例えば、非特許文献4参照)、70%の高い効率でアルキル化を引き起こした。リンカー部の導入により反応性と効率が劇的に向上することを見出した。

【非特許文献4】「J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 1602」

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、上述したハイブリッド分子は、合成の困難さ、リンカー部位の不安定性、アルキル化部位の反応性等に問題点を有していた。

本発明は、従来のハイブリッド分子よりも短い反応ステップで合成でき、かつ、反応性の高いDNAアルキル化能と配列認識能を兼ね備えたピロールーイミダゾールポリアミド系の機能分子を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、ピロールーイミダゾールポリアミドの末端にインドールリンカーを介してアルキル化反応部位を有するヘアピン型ポリアミドに関する。

【0005】

本発明は、上記ヘアピン型ポリアミドを含んでなる遺伝子の発現を抑制、もしくは、活性化する薬剤に関する。

【0006】

本発明は、上記ヘアピン型ポリアミドを含んでなる抗ガン性を有する薬剤に関する。

【発明の効果】

【0007】

本発明は遺伝子上に存在する特定の塩基配列に対して、選択的にアルキル化する機能分子である。この機能分子は、分子内のイミダゾールとピロールの配置を変えることで、認識する塩基配列を変えることが可能である。また、その合成方法は多品種供給を行う上でも実用的であり応用性が高い。

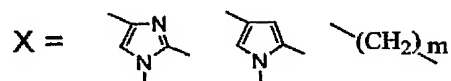
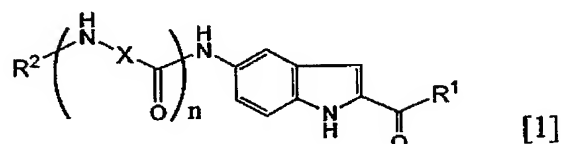
このことは、ヒトゲノム上で、重要な遺伝子配列、或いはガンなどの病気に由来した遺伝子異常に対する有用な論理的な薬剤として、遺伝子レベルでの創薬を実現するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明のヘアピン型ポリアミドは、一般式 [1]

【化13】

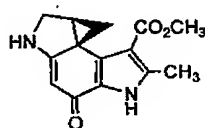


(式中、m, n はそれぞれ独立した 0-10 の整数を表し、X はそれぞれ独立した上記構造により任意に構成される。R¹ はアルキル化反応部位を表し、R² は水素原子、アルキル基又はアセチル基からなるピロール-イミダゾールポリアミド化合物を表す。) で示される化合物が挙げられる。

【0009】

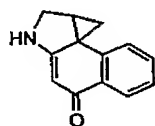
一般式 [1] において、R¹ で表されるアルキル化反応部位としては、DNA 上に存在する特定の塩基配列に対して、アルキル化能と配列認識能を兼ね備えた基であればどのような基でも良いが、例えば構造式

【化14】



で示される C P I である D U-86 のセグメント A (D u 86) の残基や、構造式

【化15】



で示される C B I である 1, 2, 9, 9 a-テトラヒドロシクロプロパ [c] ベンゾ [e] インドール-4-オンの残基や、構造式

【化16】



で示される *sec*-CBI である 1-クロロメチル-5-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロ-3H-ベンゾ[e]インドルの残基が挙げられる。

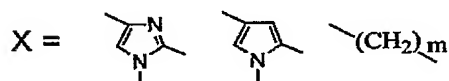
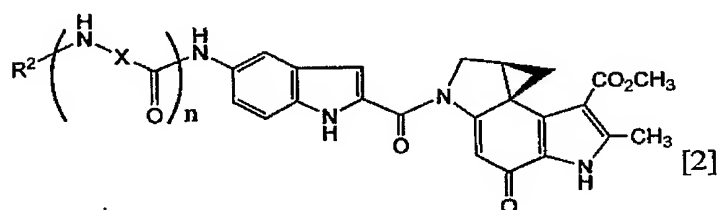
【0010】

一般式 [1] において R^2 で表されるアルキルとしては、例えば炭素数 1~20、好ましくは 1~10、より好ましくは 1~6 の直鎖状又は分岐状の低級アルキル基が挙げられ、具体例としては、例えばメチル基、エチル基、*n*-プロキル基、イソプロキル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等が挙げられる。また、*m* で表される整数としては、通常 1~6、好ましくは 2~3 の整数が挙げられ、*n* で表される整数としては、通常 1~20、好ましくは 2~7 の整数が挙げられる。

【0011】

一般式 [1] で示される化合物の例としては、例えば下記一般式 [2]

【化 17】

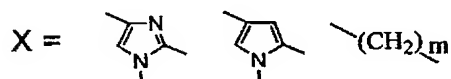
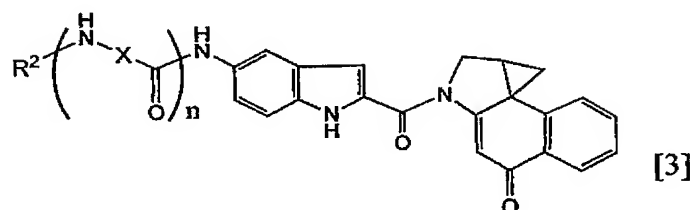


(式中、*m*, *n* はそれぞれ独立した 0~10 の整数を表し、*X* はそれぞれ独立した上記構造により任意に構成される。 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセチル基から構成されたピロール-イミダゾールポリアミド化合物を表す。) で示される化合物が挙げられる。

【0012】

一般式 [1] で示される化合物の例としては、例えば下記一般式 [3]

【化 18】

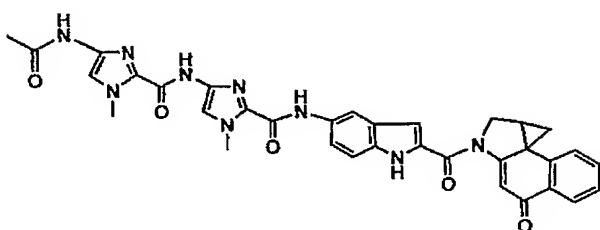


(式中、*m*, *n* はそれぞれ独立した 0~10 の整数を表し、*X* はそれぞれ独立した上記構造により任意に構成される。 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセチル基から構成されるピロール-イミダゾールポリアミド化合物を表す。) で示される化合物が挙げられる。

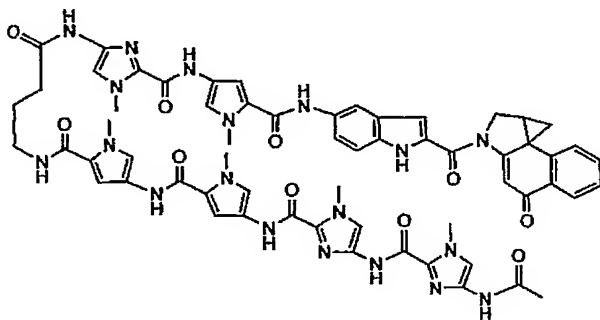
【0013】

一般式 [3] で示される化合物の具体例としては、例えば下記構造式

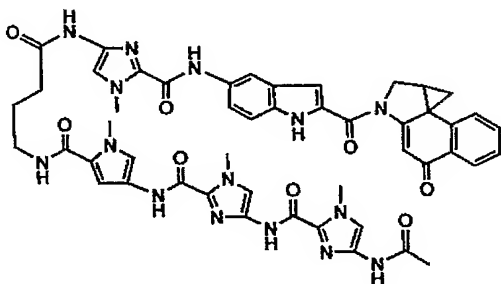
【化 19】



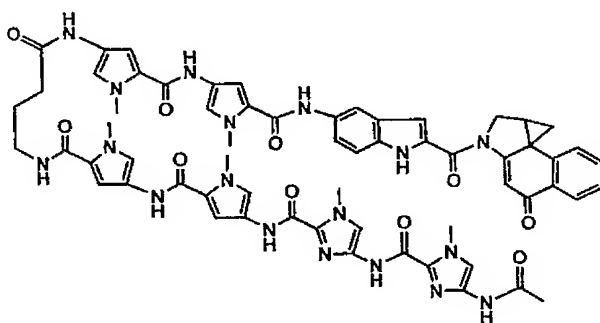
【化 20】



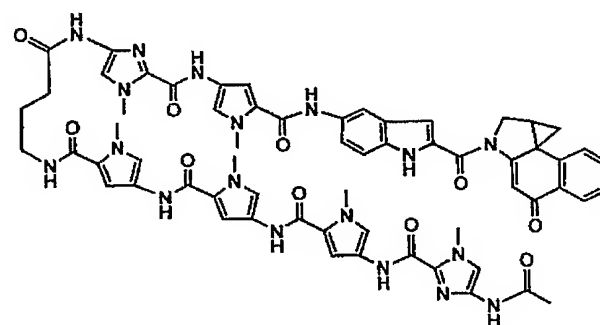
【化 21】



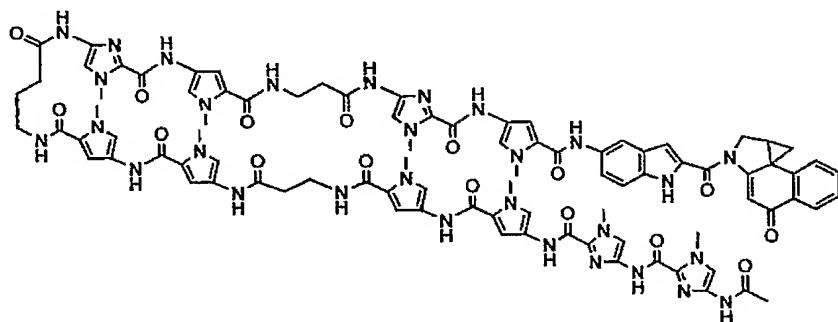
【化 22】



【化 23】



【化 2 4】

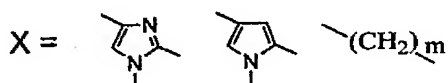
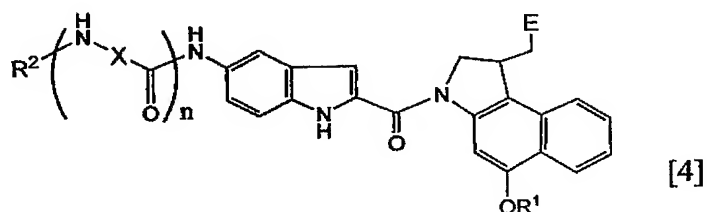


で示されるヘアピン型ポリアミド等が挙げられる。

【0014】

一般式 [1] で示される化合物の例としては、例えば下記一般式 [4]

【化 2 5】



(式中 R^1 は水素原子、又は、水溶性エステル誘導体を表し、 R^2 は水素原子、アルキル基又はアセチル基を表す。 m , n はそれぞれ独立した 0-10 の整数を表し、 E はハロゲン原子、又は、メシル基、トシル基などの脱離性の高い置換基を示す。 X はそれぞれ独立した上記構造により任意に構成されるピロール-イミダゾールポリアミド化合物を表す。) で示されるヘアピン型ポリアミドが挙げられる。

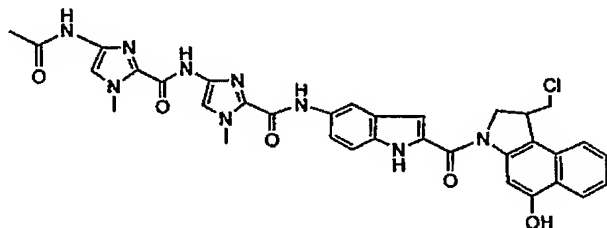
【0015】

一般式 [4] において E で表されるハロゲンとしては、例えば臭素、フッ素、ヨウ素、好ましくは塩素が挙げられる。 R^1 は、具体例としては、ペプチド鎖、タンパク、単糖類、二糖類、多糖類、ポリエチレングリコール類等が挙げられる。また、また、 m で表される整数としては、通常 1-6, 好ましくは 2-3 の整数が挙げられ、 n で表される整数としては、通常 1-20, 好ましくは 2-7 の整数が挙げられる。

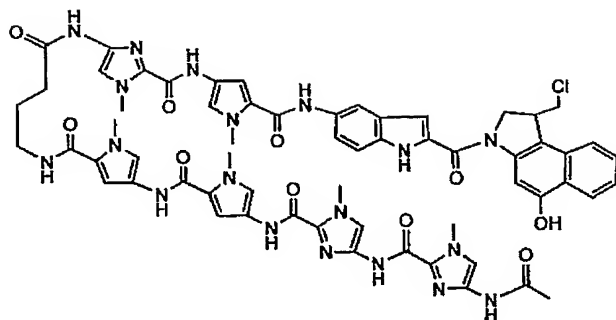
【0016】

一般式 [4] で示される化合物の具体例としては、例えば下記構造式

【化 2 6】



【化 27】

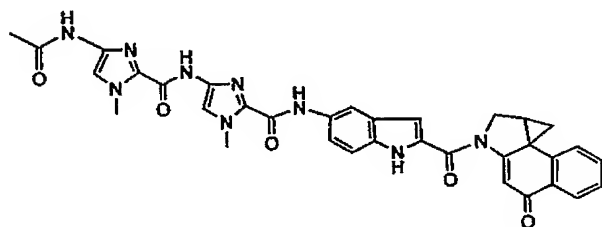


で示されるヘアピン型ポリアミド等が挙げられる。

【0017】

本発明のヘアピン型ポリアミドの合成法の概略を

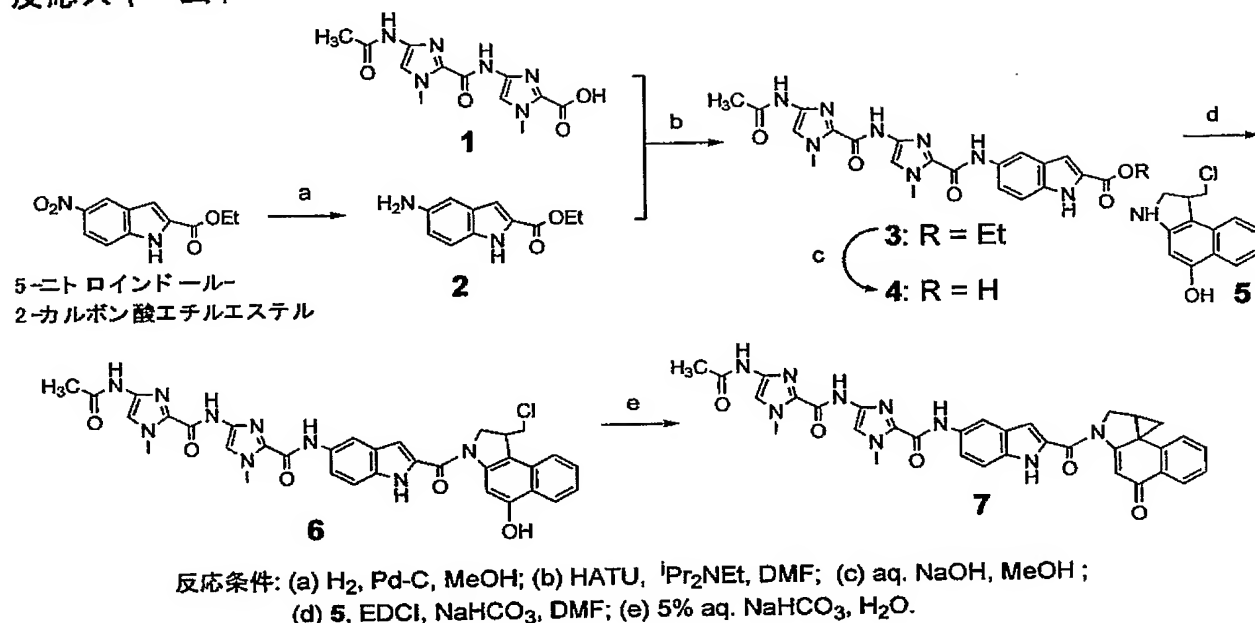
【化 28】



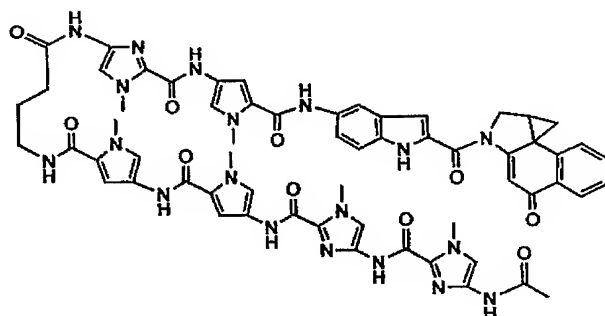
を例にして反応スキーム 1 に示す。すなわち、AcImImCO₂H (1) と 5-ニトロインドール-2-カルボン酸エチルエステルを接触還元により合成したアミノ体 2 をジメチルホルムアミド (DMF) に溶かし、この溶液に縮合剤 0- (7-アザベンザトリアゾール-1-イル) -1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート (HATU)、ジイソプロピルエチルアミン (ⁱPr₂NEt) を加えることにより縮合反応を行い、Py-Imインドールエチルエステル 3 へと変換した。3 をアルカリ加水分解条件に付すことによって、カルボン酸 4 を得た。アルキル化部として、市販品より合成可能である seco-CBI (5) を選択し、Py-Imポリアミドとのカップリングを行なった。その開環体 6 を、水中弱アルカリ条件 (NaHCO₃) で処理することにより、環化体 7 へと変換することができた。化合物 6、7 は 0.1% 酢酸-アセトニトリルのグラジエント条件下での逆相 HPLC により分取、精製を行ない、¹H-NMR 及びエレクトロスプレーマスにより構造確認した

【0018】

【化 29】
反応スキーム 1



【0019】
【化 30】

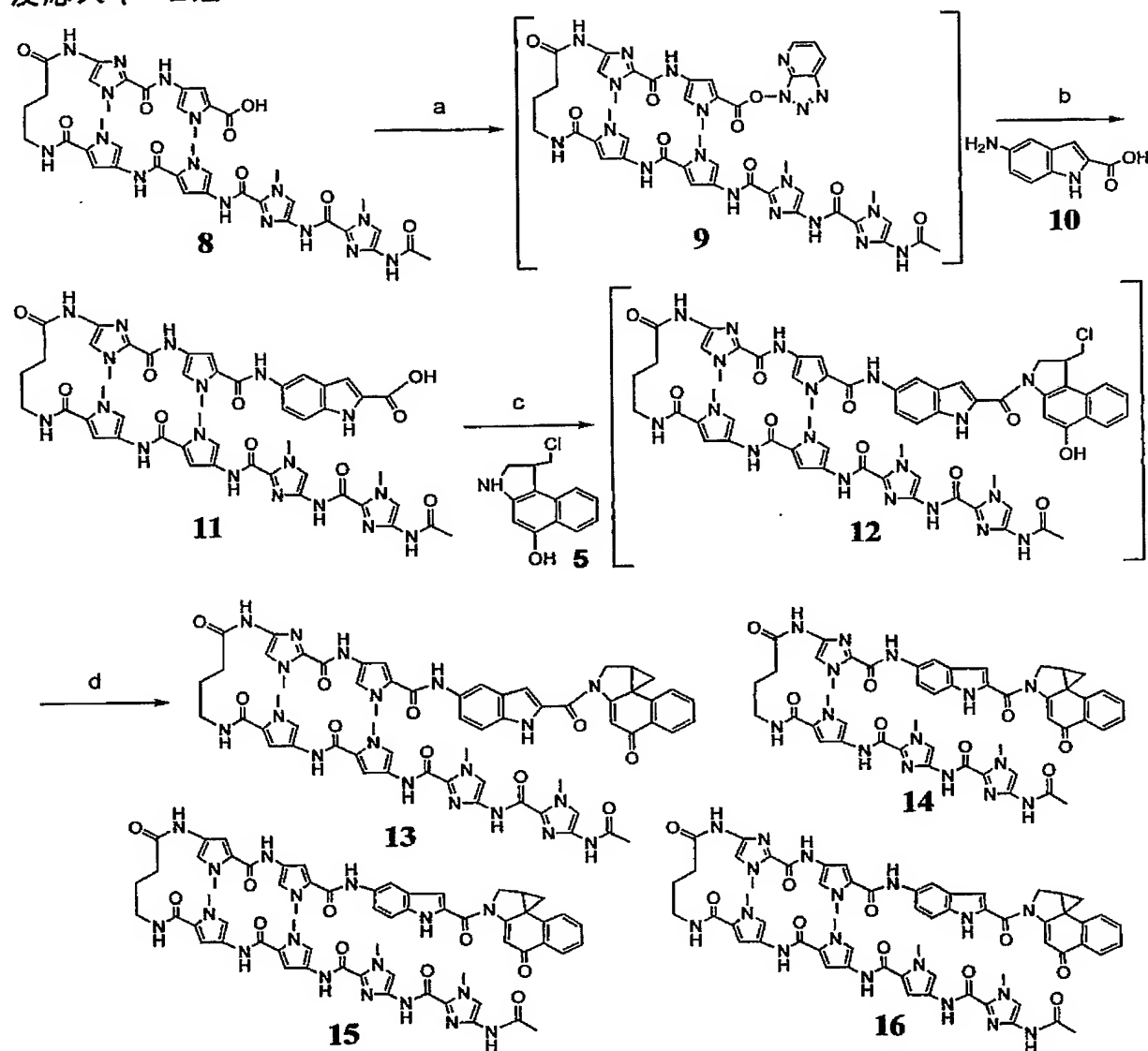


等の合成は反応スキーム 2 に示す方法で行った。すなわち、oxime resinを用いる Py-Im ポリアミドの Fmoc 固相合成法を活用して、これまでのヘアピン型 Py-Im ポリアミドに対応するカルボン酸 8 を合成した。次に、カルボン酸 8 と HATU を用いて反応系中で活性 At エステル 9 へと変換した後、そこにアミノインドールカルボン酸 10 を加えることによって、一挙にインドールカルボン酸 11 を合成した。アルキル化部として、市販の 1, 3-ナフタレンジオールより合成可能である seco-CBI 5 を選択し、Py-Im ポリアミドとのカップリングを行い、開環体 12 を合成した。12 に対して、弱アルカリ条件 (NaHCO_3) で処理することにより、環化体 13 を合成した。環化体 14、15、および 16 も同様の方法に従って合成した。化合物は 0.1% 酢酸-アセトニトリルのグラジエント条件下での逆相 HPLC により分取、精製をおこない、¹H-NMR および、エレクトロスプレーマスにより構造確認した。

【0020】

【化31】

反応スキーム2



反応条件: (a) HATU, $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, DMF; (b) 10, $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, DMF; (c) 5, EDCI, NaHCO_3 , DMF; (d) 5% aq. NaHCO_3

【0021】

本発明で使用する有効成分化合物は、その薬理学的に許容しうる塩であってもよく、該塩としては、通常用いられる塩、例えば、塩酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、スルホン酸塩等の酸との塩や、メチルアミン、エチレンジアミン等の有機塩等の塩基との塩が挙げられる。

【0022】

本発明の化合物又はその薬理学的に許容しうる塩は、次のような特徴を有する。

- (a) ガン細胞内への取り込みが高く、少量で効果が期待できる。
- (b) 酸又はアルカリ性に安定で、経口吸収性が期待できる。
- (c) 特定遺伝子の発現を制御することが可能である。
- (d) 従来のDNAアルキル化剤に比べて、正常細胞に対する障害がない。

【0023】

本発明の化合物は、遺伝子の発現を制御することにより、各種疾患に対して治療効果が期待されるが、特に、ガンの治療、予防に対して有用であり、深部のガンに対して使用できる。

【0024】

本発明の化合物を抗ガン剤として使用する場合は、注射剤、錠剤、散剤、カプセル剤など通常使用されている剤型で製剤化される。製剤化にあたっては、通常使用されている薬学的に許容される担体、例えば、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶剤、分散剤、安定化剤、色素、香料等が使用できる。製剤中の化合物の量は、化合物の種類や剤型により異なるが、通常0.2～50重量%である。

【0025】

本発明の化合物を抗ガン剤として使用する場合は、その投与量は年齢、体重、病態、治療効果、投与方法、投与時期、投与日数、投与期間により異なるが、通常1日一回10～400mgを1、2又は3週間投与し、1週間休薬する方法を1コースとし、繰り返し投与する。

【0026】

ガンの種類は問わないが、遺伝子の異常をより多く発現しているガンに対して使用される。特に、従来の抗ガン剤が効果を発揮しづらいガンの遺伝子異常に対して使用される。

【実施例】

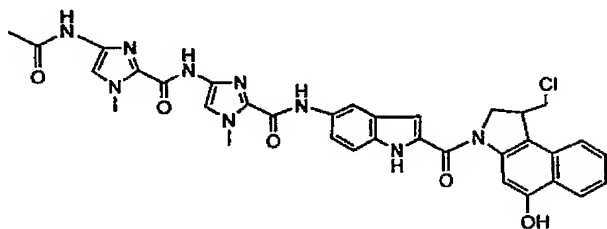
【0027】

以下、本発明を試験例及び実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら試験例及び実施例により何ら限定されるものでない。

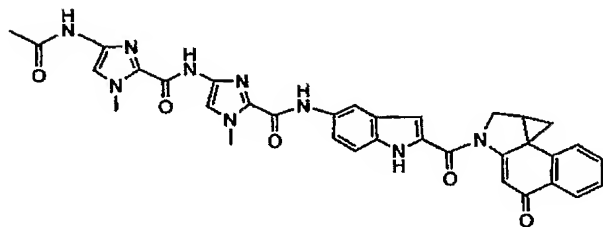
【試験例1】

直鎖DNA (400bp～) に対するアルキル化能

【化32】



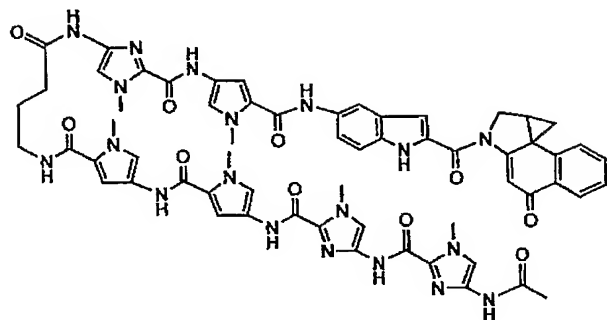
【化33】



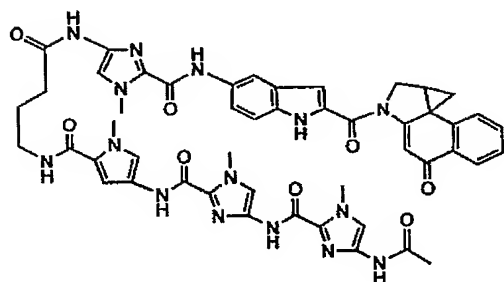
のDNAとの反応について長鎖DNA (pUC-11') を用いて検討した。アルキル化反応を23℃下8時間行い、配列決定用ポリアクリルゲル電気泳動によりアルキル化配列を解析した結果を図1に示す。その結果、開環体6、環化体7は同じ配列特異性を持って、site 1 (5'-CGGCCA-3') のAdenineを選択的にnM濃度下でアルキル化した。この配列特異性は、DNAマイナーグループ内で二量化して塩基配列を認識しているモデルによって説明できる。

【0028】

【化34】



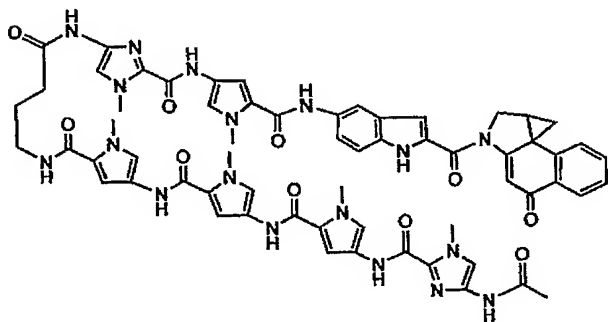
【化35】



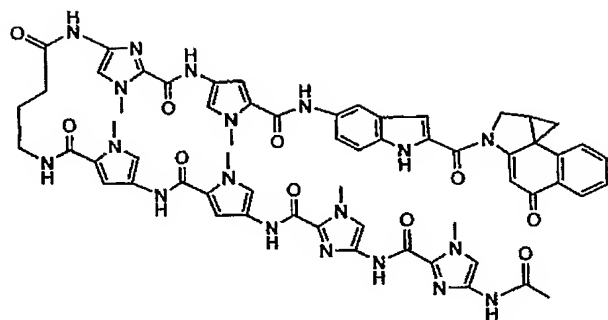
のDNAとの反応について長鎖DNA (pUC-11 and pUC-1') を用いて検討した。アルキル化反応を8時間行い、配列決定用ポリアクリルゲル電気泳動を用いて解析した結果を図2に示す。その結果、13, 14共に、以前のビニルリンカーを有するPy-Imポリアミドと比較しても遜色のない効率的なDNAアルキル化をnM濃度で観察することができた。しかしながら、配列認識能においては、違いが見られた。すなわち、14においては、マッチ配列であるsite 4 (5'-AGCCA-3') のアルキル化を観察できたものの、一方で、site 1 (5'-AGCTA-3'), site 2 (5'-AGTCA-3'), site 5 (5'-TACCA-3') 等の一塩基対ミスマッチ配列も観察された。対照的に、13においては、site 3 (5'-TGACC-3'), site 6 (5'-AGTCC-3') のマッチ配列のみにアルキル化を観察することができ、配列認識能においては13の分子設計が優れていた。興味深いことに、pUC-1' には14のマッチ配列にあたるsite (5'-TGCCG-3') も含まれているが、そのグアニンへのアルキル化は全く観察することはできなかった。図2の結果も考慮すると、このインドールリンカーとCBIの組み合わせは、高い配列特異性をもって、アデニンのN-3位をアルキル化すると考えられる。配列認識において、インドールリンカーはPy様の役割を果たしながら、CBIのシクロプロパン環とアデニンのN-3位の距離をアルキル化が起きるように調節していると考えられる。(図3)

【0029】

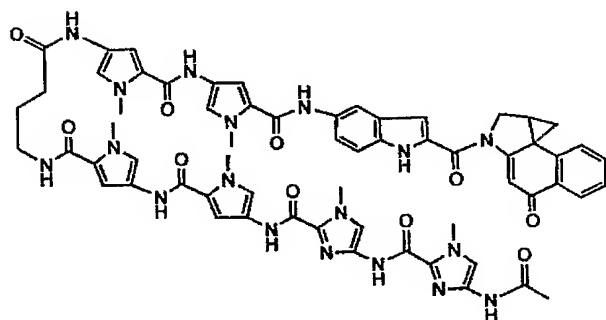
【化36】



【化37】



【化38】



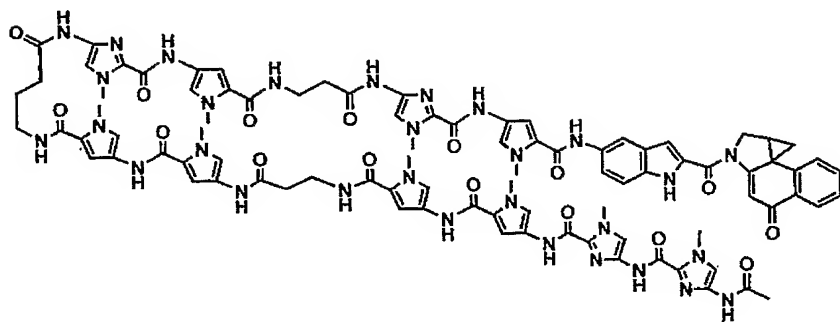
のDNAとの反応について長鎖DNA (λ -F10906) を用いて検討した。13と異なる配列認識能をもった15、16も、同様の方法に従って、固相合成を活用して合成した後、そのDNAアルキル化能を評価した結果を図4に示す。

13による配列特異的DNAアルキル化 (site 2 and 3: 5'-TGACCAA-3', site 4: 5'-AGACCA-3', site 5: 5'-TGTCCAA-3') をnM濃度で図2の結果と同様に観察した。16による配列特異的DNAアルキル化 (site 6: 5'-AATCCA-3', site 7: 5'-TAACCA-3') もnM濃度で観察することができた。一方で、15は、ミスマッチ配列 (site 1: 5'-TGCTCAA-3') に対するアルキル化のみが観察された。これらの結果は、インドールリンカーを含むヘアピン型Py-Imポリアミドの分子設計において、Py-Imの配置を変えるだけで、自在に異なる配列認識能を持ったアルキル化剤にできる可能性を示している。

【0030】

インドールリンカーを用いる合成経路の確立によって、これまでのビニルリンカーでは合成が不可能であったより長い塩基配列認識能を持つアルキル化剤の合成も可能になった。oxime resinを用いるPy-ImポリアミドのFmoc固相合成法は、長い配列認識能を有するPy-Imカルボン酸を供給することができるので、

【化39】



の合成が可能になった。p Q B I 6 3 由来の DNA フラグメントに対してアルキル化の検討を行った結果、n M 濃度での 1 7 による 1 0 0 0 塩基対 DNA に対する効率よいアルキル化を確認することができた (図 5)。一方で、1 b p m i s - m a t c h 認識によるアルキル化 (s i t e 2) が観察されたものの、A T - r i c h な塩基配列 (s i t e 1 a n d 3) に対するアルキル化も観察された。1 7 のような長い認識能を有する P y - I m ポリアミドにおいて、高い特異性を保持することは重要な課題である。今後、現在の分子設計の最適化を進めていくことで、汎用性に優れた 1 0 塩基対以上の配列認識能を有する実用的なアルキル化が可能になると考えられる。

【試験例 2】

【0031】

ヘアピン型ポリアミドの安定性

化合物 6 と 7 を用いてインドールリンカーを含む P y - I m ポリアミドの安定性を H P L C による p r o d u c t a n a l y s i s によって評価した結果を図 6 に示す。6 は、H C l 酸性 (p H = 1) 水溶液 (3 7 ° C 2 4 h 静置) 条件に対して、全く加水分解されないことが判明した。また、6 は、N a H C O ₃ アルカリ性 (p H = 9) 水溶液 (3 7 ° C 2 4 h 静置) 条件に対して、7 に変換されるが (5 0 % (3 0 m i n), 7 8 % (2 h))、他の加水分解物は全く生成しなかった。一方、7 を H C l 酸性 (p H = 1) 水溶液 (3 7 ° C) 条件に付すと、速やかに 6 に変換された (9 6 % (3 0 m i n))。すなわち、インドールリンカーを含む P y - I m ポリアミドは、酸性 (p H = 1) においては 6 のような s e c o - C B I の形で、アルカリ性 (p H = 9) においては 7 のような C B I の形で、安定に存在していることが判明した。

【試験例 3】

【0032】

ヘアピン型ポリアミドのインビトロ抗ガン作用

H C T - 1 1 6 (ヒト大腸癌由来細胞)、H e L a (ヒト子宮頸癌由来細胞)、H L C - 2 (ヒト肺癌由来細胞)、S H - S Y - 5 Y (ヒト神経芽由来細胞) を、0. 1 % の D M F を含む $10^{-5} \sim 10^{-8}$ M の A c I m I m P y P y - \gamma - I m P y - I n d o l e - C B I (1 3) で 4 8 時間処理し、この化合物の抗ガン剤としての効果を評価した。その結果、H C T - 1 1 6、H e L a、H L C - 2、S H - S Y - 5 Y に対する 5 0 % 細胞増殖阻害濃度 (I C ₅₀) は、それぞれ 7.42×10^{-8} 、 5.97×10^{-8} 、 5.35×10^{-8} 、 7.43×10^{-9} M を示した。また、2 9 3 T (ヒト腎臓由来正常細胞)、W I - 3 8 (ヒト正常繊維芽細胞) に対しても同様の評価を行った結果、I C ₅₀ はそれぞれ 6.99×10^{-8} 、 6.79×10^{-8} M を示し、正常細胞と比べてガン細胞に対して約 1 0 倍の高い抗ガン作用を示した (I C ₅₀ 値は 0. 1 % D M F で 4 8 時間処理した系をコントロールとして計算した。)

【実施例】

【実施例 1】

: 5' - テキサスレッドラベルした 4 5 0 塩基対 DNA の合成方法

【0033】

DNA フラグメント (p U C - 1') は、5' - テキサスレッドでラベルした 2 0 塩基対プライマー: 5' - T e x R e d - A G A A T C A G G G G A T A A C G C A G - 3' (p U C 1 8 f o r w a r d, 7 8 0 - 7 9 9) と 2 0 塩基対プライマー: 5' - T T A C C A G T G G C T G C T G C C A G - 3' (p U C 1 8 r e v e r s e, 1 4 5 9 - 1 4 7 8) を用いて p u c 1 8 を鋳型として P C R 法によって合成した。

DNA フラグメント (p U C - 1 1) は、5' - テキサスレッドでラベルした 2 1 塩基対プライマー: 5' - T e x R e d - T G C T G G C C T T T T G C T C A C A T G - 3' (p U C 1 8 r e v e r s e, 1 8 6 1 - 1 8 8 1) と 1 8 塩基対プライマー: 5' - T G T A A A A C G A C G G C C A G T G - 3' (p U C 1 8 f o r w a r d, 3 7 8 - 3 9 5) を用いて p u c 1 8 を鋳型として P C R 法によって合成した。同様に DNA

フラグメント (pUC-11') は、5'-テキサスレッドでラベルした18塩基対プライマー (pUC18 forward, 378-395) と21塩基対プライマー (pUC18 reverse, 1861-1881) を用いて puc18 を鋳型として PCR 法によって合成した。

DNAフラグメント (λ -F10906) は、5'-テキサスレッドでラベルした23塩基対プライマー: 5'-TexRed-ATCAGGGGCAACTCAACCCCTGTCC-3' (λ -DNA forward, 10960-10982) と20塩基対プライマー: 5'-CAGGACGACCAATATCCAGC-3' (λ -DNA reverse, 37007-37026) を用いて λ -DNA を鋳型として PCR 法によって合成した。

DNAフラグメント (pQBI63) は、5'-テキサスレッドでラベルした20塩基対プライマー: 5'-TexRed-GGTGATGTCTGGCGATATAGG-3' と20塩基対プライマー: 5'-CCCCAAGGGGTATGCTAGT-3' を用いて pQBI63 plasmid を鋳型として PCR 法によって合成した。得られたそれぞれのDNAフラグメントは Suprec-02 にてろ過精製した後、UV吸収を測定してその濃度を決定した。

【実施例2】

: ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析

【0034】

全量 $10\mu\text{l}$ の 5mM リン酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH}7.0$) 中に5'末端がテキサスレッドでラベルされたDNAフラグメント 10nM 、DMF 10% (v/v) と先に表記した濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (Eppendorf) に入れて 23°C で8時間静置した。

反応終了後、calf thymus DNA (1mM , $1\mu\text{L}$) を加え quench を行い、 90°C にて5分間振動させる。遠心減圧下得られたDNAにローディング色素 (フューシンレッドのDMF溶液) $8\mu\text{l}$ を加え溶解させた後、 94°C にて20分間振動させる。直ちに 0°C にて急冷した後、その $2\mu\text{l}$ について、HITACHI 5500-S DNAシケンサーを用いた6%変成ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った。

【実施例3】

: HPLCを用いた酸性、アルカリ性条件下での安定性の解析

【0035】

全量 $10\mu\text{l}$ の 5% HCl 水溶液 ($\text{pH}1$, DMF: $\text{H}_2\text{O}=1:9$) あるいは、 5% NaHCO_3 水溶液 ($\text{pH}9$, DMF: $\text{H}_2\text{O}=1:9$) 中に化合物6あるいは、7 ($100\mu\text{M}$) を含む反応溶液を微量遠心分離管 (Eppendorf) に入れて、 37°C 下で静置した。静置を始めてから、30分、2時間、24時間後にそれぞれHPLC ($0-100\%$ 50mM ギ酸アンモニウム-アセトニトリルリニアグラジエント, 20min , 流速: 1.0mL/min , 254nm) にて化合物 [6 (16.8min), 7 (15.1min)] の解析を行った。

【実施例4】

: 抗ガン活性の評価

【0036】

96well 平底プレートへ、HCT-116、HeLa、HLC-2、SH-SY-5Y細胞を完全培地 [10% のウシ胎児血清を含むRPM11640 (HCT-116、SH-SY-5Y; シグマアルドリッチ) および、ダルベッコ改変最小培地 (HeLa、HLC-2、293T、WI-38; シグマアルドリッチ)] 中に、それぞれ 4.0×10^3 、 3.6×10^3 、 1.6×10^3 、 7.0×10^2 、 5.0×10^2 、 8.0×10^2 cells/well の細胞密度で播種し、 CO_2 インキュベータにて24時間前培養を行った。次に、培地を 0.1% のDMFと $10^{-5} \sim 10^{-8}\text{M}$ の AcImImPy Py- γ -ImPy-Indole-CBI (13) を含む完全培地と交換し、 CO_2 インキュベータ内で48時間処理を行った。その後、Well当たり $10\mu\text{l}$ の cell

counting kit-8 試薬 (同仁化学) を加えて2時間、CO₂ インキュベータ内に放置し、マイクロプレートリーダーMPR-A41 (東ソー) で吸光度を測定した。

【実施例5】

: 化合物6及び7の合成反応 (スキーム1)

【0037】

(1) AcImImCO₂H (1) の合成

化合物1は、文献記載の方法 [(a) Tao, Z. -F.; Fujiwara, T.; Saito, I.; Sugiyama, H. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 4961. (b) Tao, Z. -F.; Saito, I.; Sugiyama, H. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 1602 (c) Bando, T.; Narita, A.; Saito, I.; Sugiyama, H. Chem. Eur. J. 2002, 8, 4781.] に従って合成した。

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆): δ□10.37 (s, 1H; NH), 9.60 (s, 1H; NH), 7.63 (s, 1H; CH), 7.48 (s, 1H; CH), 3.96 (s, 3H; NCH₃), 3.93 (s, 3H; NCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃); ESIMS m/e calcd for C₁₂H₁₅N₆O₄ [M⁺+H] 307.1, found 307.3.

【0038】

(2) H₂N-Indol-CO₂Et (2) の合成

化合物2は、市販の5-ニトロインドール-2-カルボン酸エチルエステルを出発原料に用いたPd-Cを用いる水素雰囲気下での接触還元により合成した。精製することなく、3の合成原料として用いた。

【0039】

(3) AcImIm-Indol-CO₂Et (3) の合成

化合物1 (305mg, 1.05mmol) と化合物2 (215mg, 1.05mmol) をDMF (2ml) に溶かし、ⁱPr₂NEt (550μl, 3.15mmol)、HATU (480mg, 1.26mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で15時間攪拌した。反応終了後、反応溶液の溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (3-5% MeOH in CH₂Cl₂, gradient elution) にて精製し、溶媒を留去することにより黄色粉体3 (326mg, 52%) を得た。

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆): δ□11.83 (s, 1H; NH), 10.32 (s, 1H; NH), 10.08 (s, 1H; NH), 9.40 (s, 1H; NH), 8.16 (s, 1H; CH), 7.60 (s, 1H; CH), 7.56 (d, 1H, J=9.0Hz; CH), 7.50 (s, 1H; CH), 7.40 (d, 1H, J=9.0Hz; CH), 7.12 (s, 1H; CH), 4.33 (q, 2H, J=7.0Hz; OCH₂), 4.01 (s, 3H; NCH₃), 3.98 (s, 3H; NCH₃), 2.03 (s, 3H; COCH₃), 1.33 (t, 3H, J=7.0Hz; CH₃); ESIMS m/e calcd for C₂₃H₂₅N₈O₅ [M⁺+H] 493.2, found 493.2.

【0040】

(4) AcImIm-Indole-CO₂H (4) の合成

化合物3 (326mg, 0.66mmol) にMeOH (8ml) と1N水酸化ナトリウム水溶液 (8ml) を加えた後、室温にて30min攪拌した。MeOHを減圧下留去した後、10% HCl水溶液を0℃下で加えて酸性 (pH2) にした。生じた沈殿物を桐山ろ取にて集めて、水洗してから乾燥し、化合物4 (297mg, 96%) を得た。

¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆): δ□11.71 (s, 1H; NH), 10.35 (s, 1H; NH), 10.08 (s, 1H; NH), 9.49 (s, 1H; NH), 8.13 (d, 1H, J=1.0Hz; CH), 7.60 (s, 1H; CH), 7.54 (dd, 1H, J=2.0, 9.0Hz; CH), 7.49 (s, 1H; CH)

), 7.38 (d, 1H, $J=9.0$ Hz; CH), 7.06 (d, 1H, $J=2.0$ Hz; CH), 4.01 (s, 3H; NCH₃), 3.97 (s, 3H; NCH₃), 2.03 (s, 3H; COCH₃); ESIMS m/e calcd for C₂₁H₂₁N₈O₅ [M⁺+H] 465.2, found 465.2.

【0041】

(5) seco-CBI (5) の合成

化合物5は、文献記載の方法 [(a) Boger, D. L.; Yun, W. Y.; Tegarden, B. R. J. Org. Chem. 1992, 57, 2873. (b) Boger, D. L.; McKie, J. A. J. Org. Chem. 1995, 60, 1271. (c) Boger, D. L.; Ishizaki, T.; Kitos, P. A.; Suntornwat, O. J. Org. Chem. 1990, 55, 5823.] に従って塩酸塩として合成を行った。スペクトルデータは文献に報告されている。

【0042】

(6) AcImIm-Indole-seco-CBI (6) の合成

化合物4 (60.3 mg, 0.13 mmol) の反応容器に secoCBI 5 (32.7 mg, 0.13 mmol) と EDCI (50.3 mg, 0.26 mmol), NaHCO₃ (41.9 mg, 0.52 mmol) を加え、DMF (700 μ l) に溶かし、8時間窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応終了を確認した後、溶媒を留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5-10% MeOH in CH₂Cl₂, gradient elution) にて精製した。得られた固体を CHCl₃ にて洗浄、乾燥した後、茶色粉体6 (85.2 mg, 96%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 11.71 (s, 1H, NH), 10.43 (s, 1H; OH), 10.34 (s, 1H; NH), 10.11 (s, 1H; NH), 9.41 (s, 1H; NH), 8.16 (s, 1H; CH), 8.12 (d, 1H, $J=8.0$ Hz; CH), 7.97 (brs, 1H; CH), 7.85 (d, 1H, $J=8.0$ Hz; CH), 7.62 (m, 1H; CH), 7.61 (s, 1H; Im-H), 7.52 (t, 1H, $J=8.0$ Hz; CH), 7.51 (s, 1H; Im-H), 7.45 (d, 1H, $J=9.0$ Hz; CH), 7.36 (t, 1H, $J=8.0$ Hz; CH), 7.19 (s, 1H; CH), 4.81 (t, 1H, $J=11.0$ Hz; NCHH), 4.56 (d, 1H, $J=11.0$ Hz; NCHH), 4.23 (brt, 1H; CH), 4.03 (s, 3H; NCH₃), 3.99 (s, 3H; NCH₃), 3.87 (dd, 2H, $J=7.0$ and 11.0 Hz; CH₂), 2.04 (s, 3H; COCH₃); ESI-TOFMS m/e calcd for C₃₄H₃₁CIN₉O₅ [M⁺+H] 680.22, found 680.23.

【0043】

(7) AcImIm-Indole-CBI (7) の合成

化合物6 (6.3 mg, 9.28 mmol) のDMF (150 μ l) 溶液中に、5% aq. NaHCO₃ (100 μ l) を加え、1h窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応終了を確認した後、溶媒を留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5-15% MeOH in CH₂Cl₂, gradient elution) にて精製した。溶媒を留去・乾燥した後、茶色粉体7 (6.0 mg, quant.) を得た。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 11.85 (s, 1H; NH), 10.35 (s, 1H; NH), 10.16 (s, 1H; NH), 9.41 (s, 1H; NH), 8.17 (s, 1H; CH), 8.00 (d, 1H, $J=8.0$ Hz; CH), 7.94 (s, 1H; CH), 7.62 (s, 1H; Im-H), 7.52 (m, 2H, CH_x2), 7.51 (s, 1H; Im-H), 7.43 (m, 2H; CH), 7.25 (d, 1H, $J=8.0$ Hz; CH), 6.95 (s, 1H; CH), 4.64 (m, 1H; NCHH), 4.49 (d, 1H, $J=10.0$ Hz; NCHH), 4.02 (s, 3H; NCH₃), 3.98 (s, 3H; NCH₃), 3.27 (brt, 1H; CH), 2.03 (s, 3H; COCH₃), 1.75 (m, 1H; CHH), 1.70 (m

, 1H; CHH); ESI-TOFMS m/e calcd for $C_{34}H_{30}N_9O_5$ $[M^+ + H]$ 644.23, found 644.21.

【実施例 6】

: 化合物 13, 14, 15 及び 16 の合成反応 (スキーム 2)

【0044】

(1) AcImImPyPy- γ -ImPyCO₂H (8) の合成

化合物 8 は、Fmoc 固相合成機により合成した。精製は、Chemco bond 5-ODS-H カラムを用いた HPLC 条件 (0-50% 0.1% 酢酸-アセトニトリルニアグラジェント, 40 min. 254 nm) にて行い、合成原料として用いた。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.32 (s, 1H; NH), 10.29 (s, 1H; NH), 10.23 (s, 1H; NH), 10.00 (s, 1H; NH), 9.91 (s, 1H; NH), 9.32 (s, 1H; NH), 8.02 (s, 1H; NH), 7.56 (s, 1H; Im-H), 7.50 (s, 1H; Im-H), 7.45 (s, 1H; Py-H), 7.44 (s, 1H; Im-H), 7.27 (s, 1H; Py-H), 7.16 (s, 1H; Py-H), 7.14 (s, 1H; Py-H), 6.92 (s, 1H; Py-H), 6.89 (s, 1H; Py-H), 4.00 (s, 3H; NCH₃), 3.97 (s, 3H; NCH₃), 3.93 (s, 3H; NCH₃), 3.84 (s, 3H; NCH₃), 3.81 (s, 3H; NCH₃), 3.79 (s, 3H; NCH₃), 3.19 (m, 2H, CH₂), 2.34 (m, 2H; CH₂), 2.03 (s, 3H; COCH₃), 1.78 (m, 2H; CH₂); ESI-TOFMS m/e calcd for $C_{39}H_{45}N_{16}O_9$ (M+H)⁺ 881.35, found 881.36

【0045】

(2) H₂N-Indole-CO₂H (10) の合成

化合物 10 は、市販の 5-ニトロインドール-2-カルボン酸エチルエステルを出発原料に用いた二工程反応 ((i) 1N NaOH によるアルカリ加水分解、(ii) Pd-C を用いる水素雰囲気下での接触還元) により合成した。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.22 (s, 1H; NH), 7.11 (d, 1H, J=8.5 Hz; CH), 6.75 (d, 1H, J=2.0 Hz; CH), 6.67 (s, 1H; CH), 6.65 (dd, 1H, J=2.0, 8.5 Hz; CH), 3.31 (brs, 2H; NH₂ and H₂O).

【0046】

(3) AcImImPyPy- γ -ImPy-Indole-CO₂H (11) の合成

固相合成により得た化合物 8 (3.5 mg, 3.98 mmol) を DMF (75 μ l) に溶かし、ⁱPr₂NEt (1.4 μ l, 8.04 mmol)、HATU (1.4 mg, 3.68 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温で 4 時間攪拌した。反応の終了を確認した後、化合物 10 (1.3 mg, 7.38 mmol) と ⁱPr₂NEt (1.3 μ l, 7.46 mmol) を添加し、窒素雰囲気下、室温で overnight 攪拌した。反応後、反応溶液の溶媒を留去して、桐山漏斗で濾取しながら、残留物を CH₂Cl₂ と H₂O でそれぞれ洗浄した。その結果、化合物 11 の粗結晶 (3.0 mg, 73%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.33 (brs, 1H; NH), 10.34 (s, 1H; NH), 10.33 (s, 1H; NH), 10.27 (s, 1H; NH), 9.92 (s, 2H; NH), 9.73 (s, 1H; NH), 9.32 (brs, 1H; NH), 8.01 (brt, 1H; NH), 7.94 (s, 1H; CH), 7.56 (s, 1H; Im-H), 7.50 (s, 1H; Im-H), 7.46 (s, 1H; Im-H), 7.40 (brd, 1H, J=8.5 Hz; CH), 7.31 (brd, 1H, J=8.5 Hz; CH), 7.30 (d, 1H, J=1.5 Hz; Py-H), 7.26 (d, 1H, J=1.5 Hz; Py-H), 7.17 (d, 1H, J=1.5 Hz; Py-H), 7.16 (s, 2H; Py-H_{x2}), 6.90 (d, 1H, J=1.5 Hz; Py-H), 6.85 (brs, 1H; CH), 4.00 (s, 3H; NCH₃),

3.97 (s, 3H; NCH₃), 3.95 (s, 3H; NCH₃), 3.85 (s, 3H; NCH₃), 3.84 (s, 3H; NCH₃), 3.80 (s, 3H; NCH₃), 3.20 (dt, 2H, J=6.0, 7.5 Hz; CH₂), 2.36 (t, 2H, J=7.5 Hz; CH₂), 2.04 (s, 3H; COCH₃), 1.79 (qu, 2H, J=7.5 Hz; CH₂); ESI-TOFMS m/e calcd for C₄₈H₅₁N₁₈O₁₀ [M⁺+H] 1039.40, found 1039.39.

【0047】

(4) AcImImPyPy-γ-ImPy-Indole-CBI (13) の合成
粗結晶11 (3.0 mg, 2.89 mmol) の入った反応容器に続けて secoCBI 5 (1.4 mg, 6.01 mmol) と EDCI (1.2 mg, 6.25 mmol), NaHCO₃ (1.0 mg, 12.0 mmol) を加え、DMF (100 μl) に溶かし、2時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応の終了を確認した後、5% NaHCO₃ を 300 μl, DMF (300 μl) を添加し、30分間、攪拌を行った。反応後、溶媒を留去し、残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5-15% MeOH in CH₂Cl₂, gradient elution) にて精製し、溶媒を留去することにより粗結晶13 (1.33 mg, 27% for 2 Steps) を得た。さらに、HPLC (0-50% 0.1% 酢酸-アセトニトリルリニアグラジエント, 40 min, 254 nm) にて精製を行い、減圧濃縮、凍結乾燥後、黄色結晶13 (0.5 mg, 0.41 μmol: 11% for 2 steps) を得た。

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.77 (s, 1H; NH), 10.32 (s, 1H; NH), 10.29 (s, 1H; NH), 10.26 (s, 1H; NH), 9.95 (s, 1H; NH), 9.92 (s, 1H; NH), 9.82 (s, 1H; NH), 9.33 (s, 1H; NH), 8.08 (s, 1H; CH), 8.01 (br s, 1H; NH), 8.00 (d, J=7.5 Hz, 1H; CH), 7.60 (t, J=7.5 Hz, 1H; CH), 7.56 (s, 1H; CH), 7.53 (d, J=8.5 Hz, 1H; CH), 7.50 (s, 1H; CH), 7.46 (s, 1H; CH), 7.43 (t, J=7.5 Hz, 1H; CH), 7.42 (s, 1H; CH), 7.31 (s, 1H; CH), 7.27 (s, 1H; CH), 7.24 (d, J=8.5 Hz, 1H; CH), 7.22 (s, 1H; CH), 7.19 (s, 1H; CH), 7.16 (d, J=7.5 Hz, 1H; CH), 7.06 (s, 1H; CH), 6.95 (s, 1H; CH), 6.89 (s, 1H; CH), 4.62 (dd, J=10.0, 5.0 Hz, 1H; NCH₂), 4.48 (d, J=10.0 Hz, 1H; NCH₂), 4.00 (s, 3H; NCH₃), 3.97 (s, 3H; NCH₃), 3.95 (s, 3H; NCH₃), 3.86 (s, 3H; NCH₃), 3.84 (s, 3H; NCH₃), 3.80 (s, 3H; NCH₃), 3.20 (m, 2H; CH₂), 2.90 (m, 1H; CH), 2.35 (m, 1H; CH₂), 2.03 (s, 3H; COCH₃), 1.79 (m, 2H; CH₂), 1.76 (dd, J=7.5, 5.0 Hz, 1H; CH), 1.70 (t, J=5.0 Hz, 1H; CH); ESI-TOFMS m/e calcd for C₆₁H₆₀N₁₉O₁₀ [M⁺+H] 1218.48, found 1218.48.

【0048】

(5) AcImImPyPy-γ-Im-Indole-CBI (14) の合成

化合物14は、化合物13と同様の合成手順により合成した。精製は、Chemcobond 5-ODS-Hカラムを用いたHPLC条件 (0-50% 0.1% 酢酸-アセトニトリルリニアグラジエント, 40 min, 254 nm) にて行い、DNAアルキル化反応に用いた。ESI-TOFMS m/e calcd for C₄₉H₄₈N₁₅O₈ [M⁺+H] 974.37, found 974.26.

【0049】

(6) AcImImPyPy-γ-PyPy-Indole-CBI (15) の合成

化合物15は、化合物13と同様の合成手順により合成した。精製は、Chemcobond 5-ODS-Hカラムを用いたHPLC条件 (0-50% 0.1% 酢酸-アセトニ

トリルリニアグラジエント, 40 min, 254 nm) にて行い、DNAアルキル化反応に用いた。ESI MS m/e calcd for $C_{62}H_{61}N_{18}O_{10}$ [$M^+ + H$] 1217.5, found 1217.4.

【0050】

(7) AcImPyPyPy- γ -ImPy-Indole-CBI (16) の合成

化合物16は、化合物13と同様の合成手順により合成した。精製は、Chemcobond 5-ODS-Hカラムを用いたHPLC条件 (0—50% 0.1%酢酸—アセトニトリルリニアグラジエント, 40 min, 254 nm) にて行い、DNAアルキル化反応に用いた。ESI-TOFMS m/e calcd for $C_{62}H_{61}N_{18}O_{10}$ [$M^+ + H$] 1217.5, found 1217.4.

【実施例7】

: 化合物17の合成反応

【0051】

(1) AcImImPyPy β PyPy- γ -ImPy β ImPy-Indole-CBI (17) の合成

化合物17は、化合物13と同様の合成手順により合成した。精製は、Chemcobond 5-ODS-Hカラムを用いたHPLC条件 (0—50% 0.1%酢酸—アセトニトリルリニアグラジエント, 40 min, 254 nm) にて行い、DNAアルキル化反応に用いた。

ESI MS m/e calcd for $C_{90}H_{93}N_{30}O_{16}$ ($M+H$)⁺ 1849.7, found 1850.1.

試薬 [N, N-diisopropyl ethylamine (¹Pr₂NEt)]

O-(7-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HATU)、溶媒 [N, N-dimethyl formamide (DMF)] 類は、主にAldrichなどの試薬会社より購入したものを精製なしに使用している。反応の追跡は、特に表記のない場合においては254 nm UV条件下でのhigh pressure liquid chromatography (HPLC) によってモニターした。¹H-NMRスペクトルはJEOL JNM-A500 (500 MHz) を使用し、内部標準物質としてTMS, tetramethylsilaneを用いた。また、表記中のmultiplicityは, s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), qu (quintet), m (multiplet), br (broad) と略した。Electrospray ionization mass spectra (ESI-MS) はPE SCIEX API 165を使用した。Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOFMS) にはBioTOF 11 (Bruker Daltonics) mass spectrometerを使用した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動はHITACHI 5500-S DNA Sequencerを使用し、そのloading dye (dimethyl formamide with fushin red) はAmersham Co. Ltd. より購入した。50% Long RangerTM gel solutionはFMC Bioproductsから購入し、Calfin testine alkaline phosphatase (AP, 1000 unit/mL) はBoehringer Mannheimから購入した。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、長鎖DNA (pUC-11 and 11') に対する化合物6と7のDNA配列特異的アルキル化能とその塩基配列認識モデルを示す。

【図2】図2は、長鎖DNA (pUC-11 and 11') に対する化合物13と14のDNA配列特異的アルキル化能とその塩基配列認識モデルを示す。

【図3】図3は、化合物13の塩基配列特異的DNAアルキル化モデルを示す。

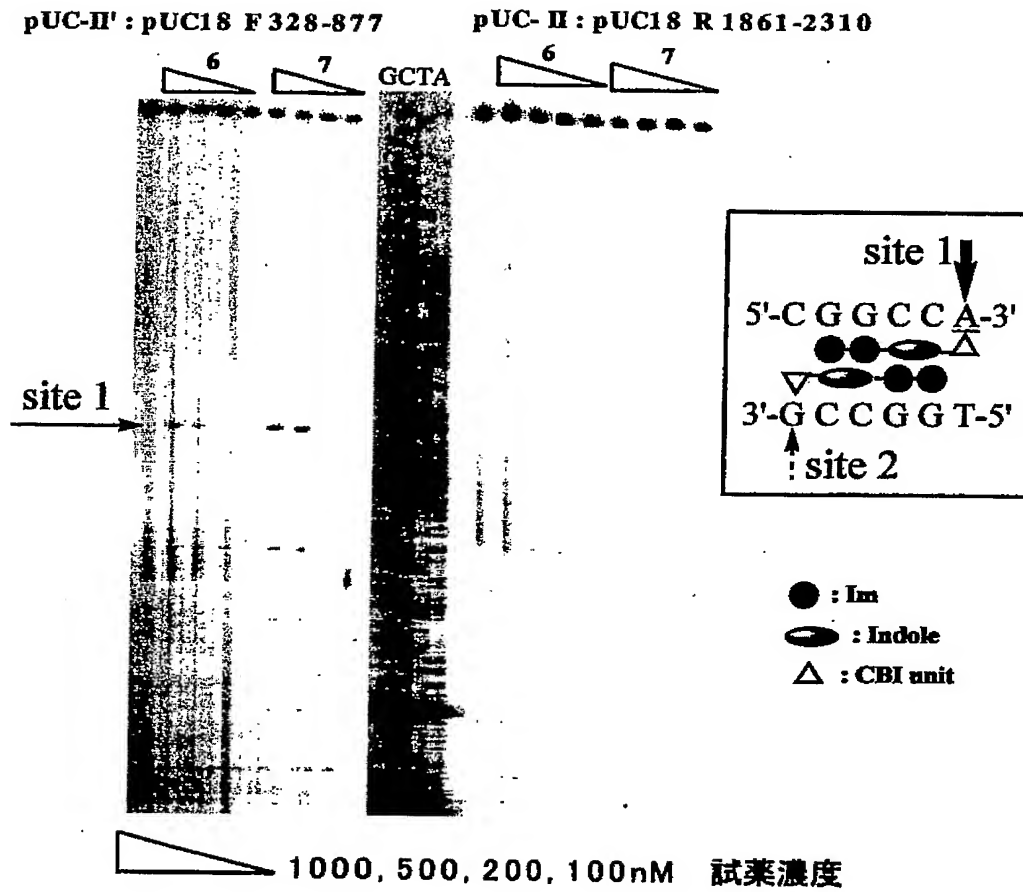
【図4】図4は、長鎖DNA (λ -F10906) に対する化合物13、15及び16のDNA配列特異的アルキル化能とその塩基配列認識モデルを示す。

【図5】図5は、長鎖DNA (pQBI63) に対する化合物17のDNA配列特異的アルキル化を示す。

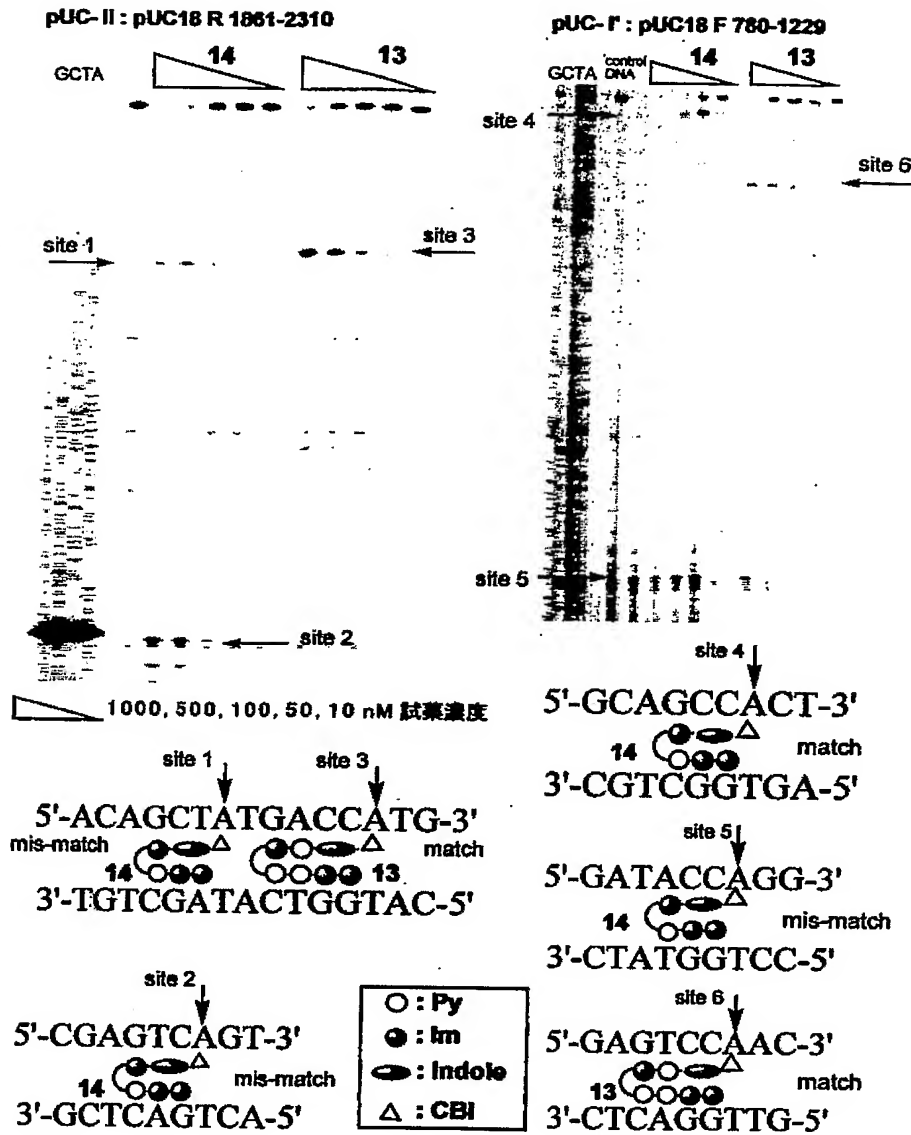
【図6】図6は、化合物6と7の酸性、アルカリ性条件下での安定性を示す。

【書類名】 図面

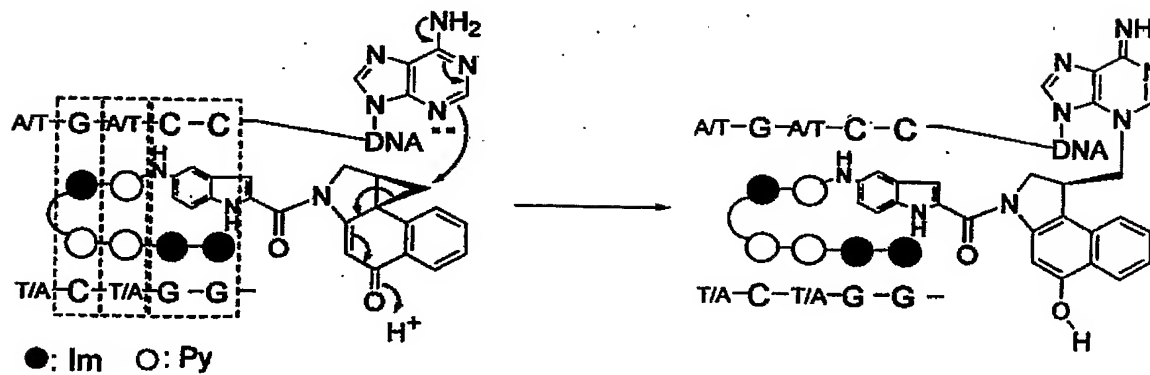
【図 1】



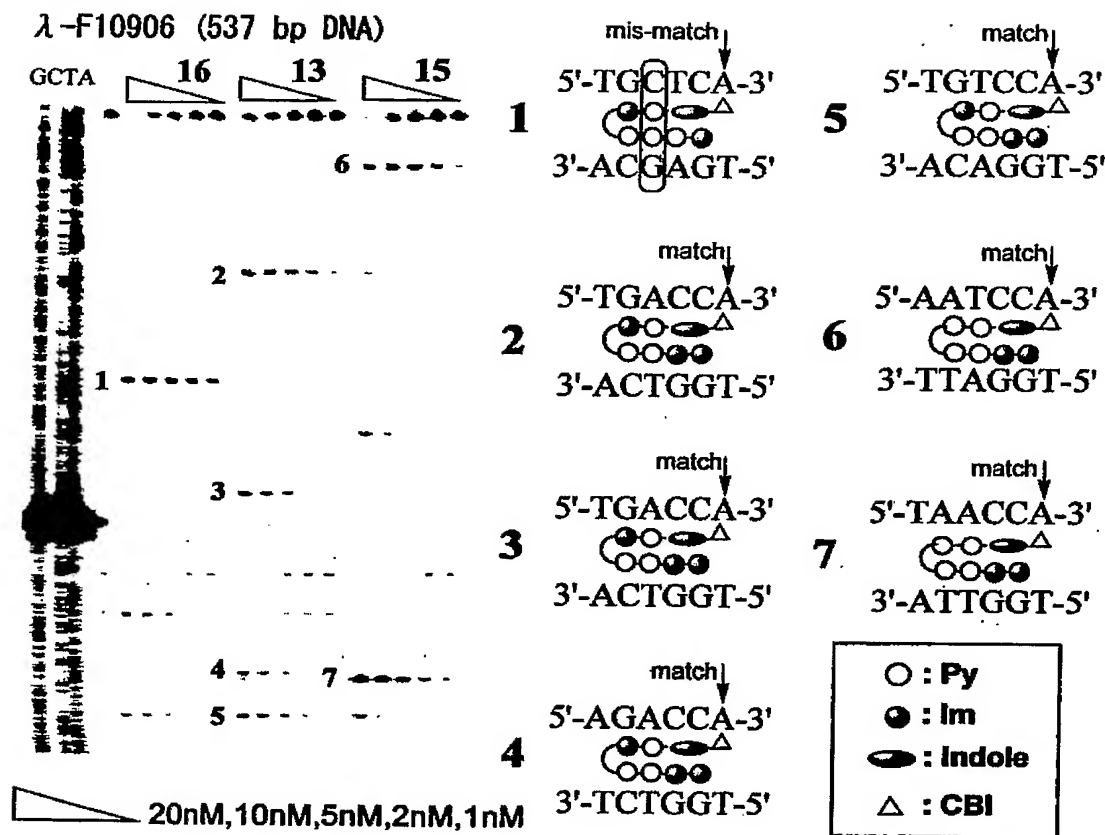
【図 2】



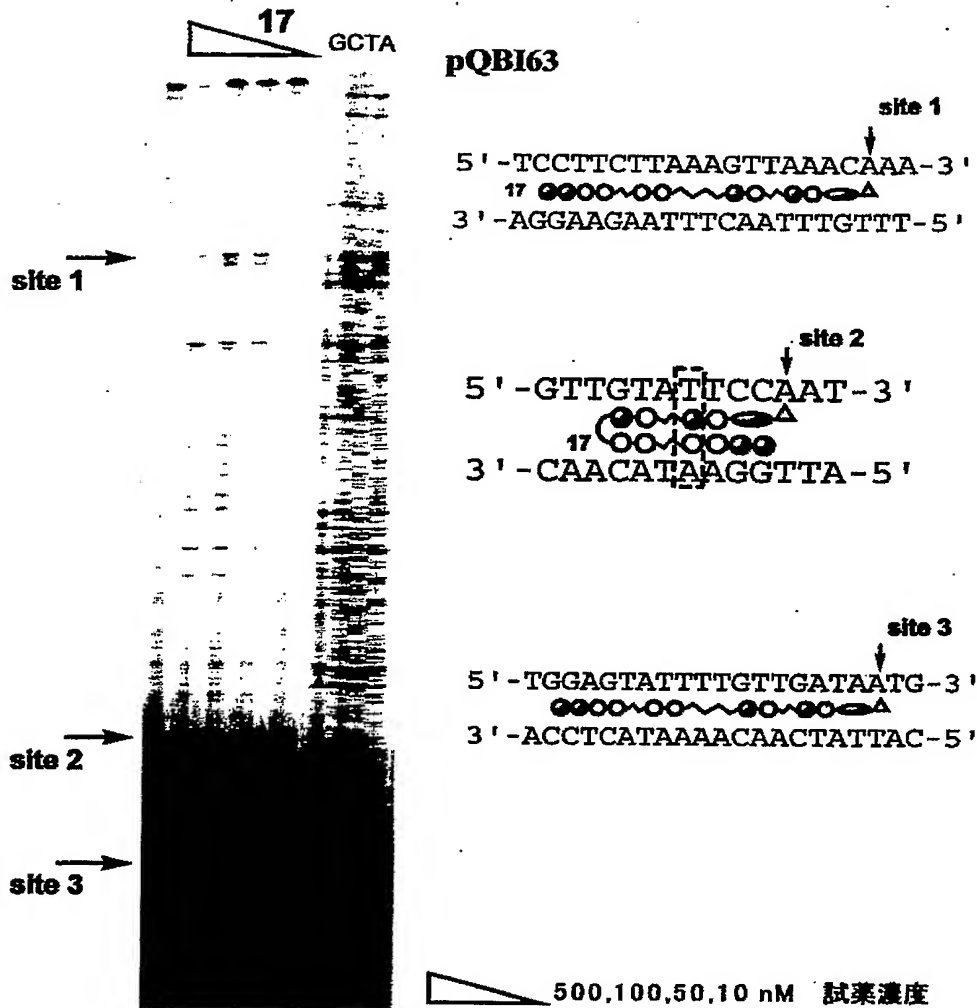
【図 3】



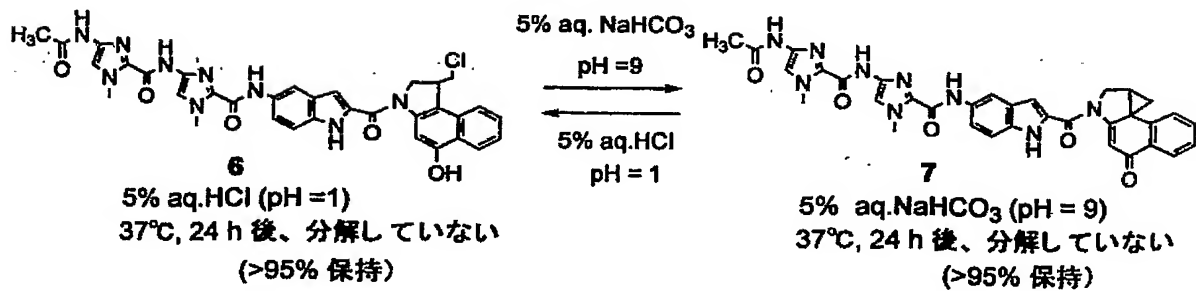
【図 4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 現在までのアルキル化ヘアピン型ポリアミドは合成収率が低く、更に、アルキル化反応に重要なビニルリンカー部位には化学安定性に問題があった。そのためペプチド合成機を用いた自動合成を組み合わせることができず、様々な塩基配列に対応したアルキル化ヘアピン型ポリアミドを合成することができなかった。

【解決手段】 高いアルキル化能力をもち、かつ安定なリンカーを検討した結果、ヘアピン型ポリアミドとアルキル化部分の間にインドールリンカーを結合することで問題を解決した。本発明は、正確にDNAの塩基配列を認識し、ガン細胞に対して効果を示した。インドールリンカーと固相合成を組み合わせた合成経路の確立により、アルキル化機能分子の供給が可能となり、ガン細胞に特有の遺伝子配列を認識できる能力を持つ新抗ガン剤を、開発する可能性が見出された。

特願 2 0 0 4 - 1 1 4 7 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 4 1 4 0 8 9 7]

- | | |
|----------|------------------------|
| 1. 変更年月日 | 2 0 0 4 年 3 月 1 3 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 東京都港区赤坂 3 丁目 2 1 番 8 号 |
| 氏 名 | テムリック株式会社 |
| | |
| 2. 変更年月日 | 2 0 0 4 年 1 2 月 2 日 |
| [変更理由] | 住所変更 |
| 住 所 | 東京都港区赤坂 3 丁目 4 番 3 号 |
| 氏 名 | テムリック株式会社 |